

Gatunek rośliny, której dotyczy sprawozdanie:

Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.)

Autor/autorzy:

MICHAŁ KSIĄŻKIEWICZ, PIOTR PLEWIŃSKI, SANDRA RYCHEL, MAGDALENA TOMASZEWSKA, ANETA SAWIKOWSKA, WOJCIECH BIELSKI, BOGDAN WOLKO

Afiliacja:

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Adres korespondencyjny, adres e-mail i nr telefonu Kierownika Tematu:

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, mksi@igr.poznan.pl, 61-6550268

Informacja o dotacji:

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji nr HOR hn-801-8/14, Zadanie nr 39

Tytuł zadania w języku polskim:

Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne

Tytuł zadania w języku angielskim:

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin – genetic and molecular backgrounds

Słowa kluczowe w porządku alfabetycznym (do 7 słów):

fenotypowanie, mapowanie genetyczne, sekwencjonowanie DNA, sekwencjonowanie RNA, termin kwitnienia, wernalizacja

Realizację zadania podzielono na cztery tematy badawcze.

Cel tematu badawczego 1:

Otrzymanie linii pokolenia F₅ z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14 oraz poznanie wymagań wernalizacyjnych wybranych linii z kolekcji łubinu żółtego.

W stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F₄ obu wariantów populacji mapującej łubinu żółtego. Uzyskano plon z 200 linii z każdej kombinacji krzyżówkowej. Po ręcznej obróbce strąków uzyskano nasiona w liczbie wystarczającej (z rezerwą dodatkowych 200 linii na ewentualne powtórzenia) do kontynuacji prac w następnych latach.

Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia zostało założone w warunkach szklarniowych (z wernalizacją i bez wernalizacji). Badano 108 linii łubinu żółtego otrzymanych ze światowej kolekcji oraz linii rodzicielskich dwóch populacji mapujących łubinu żółtego: polskich (PRH444/14 i Parys) i australijskich (Wodjil i P28213). W wariacie bez wernalizacji 112 linii osiągnęło fazę wiązania pąków oraz początek kwitnienia, 106 linii koniec kwitnienia, a 97 linii fazę dojrzałości (zbioru nasion). W wariacie z wernalizacją 111 linii osiągnęło fazę wiązania pąków oraz początek kwitnienia, zaś 110 linii koniec kwitnienia i fazę dojrzałości (zbioru nasion). Innymi słowy, bez wernalizacji 87% badanych linii wydało plon nasion, zaś z wernalizacją - aż 98%. Przy braku wernalizacji rośliny potrzebowały średnio ~63 dni do zawiązania pąków (min. ~42 / max. ~83), ~70 dni do początku kwitnienia (min. ~50 / max. ~91), ~82 dni do zakończenia kwitnienia (min. ~64 / max. ~98) i ~119 dni do dojrzałości strąków (min. ~105 / max. ~121). Przy

zastosowaniu wernalizacji terminy te były krótsze o 10-12 dni. Zaobserwowano, że linie wczesne cechowały się relatywnie niewielką odpowiedzią na wernalizację w postaci przyspieszenia kwitnienia o maksymalnie 10 dni.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 1:

1. Cecha wczesności kwitnienia łubinu żółtego jest cechą ilościową, warunkowaną przez kilka niesprzężonych ze sobą genów.
2. Linie rodzicielskie populacji mapujących łubinu żółtego istotnie różnią się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi, co umożliwia mapowanie cech ilościowych.

Cel tematu badawczego 2:

Uzyskanie zestawu markerów polimorficznych różnicujących linie rodzicielskie dwóch populacji mapujących w obrębie sekwencji homologów genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz poznanie segregacji tych markerów w liniach wsobnych populacji mapującej Wodjil×P28213.

Prace prowadzone w ramach zadania w latach 2017-2018 doprowadziły do opracowania 10 markerów dla populacji PRH444/14×Parys oraz 23 markerów dla populacji Wodjil×P28213. Markery te obejmują m. in. dwa geny z grupy *FLOWERING LOCUS T (FT)* uznane na podstawie profilowania ekspresji metodą RNA-seq za geny kandydujące. W 2019 roku generowano markery dla pozostałych dwóch genów *FT* wykazujących zróżnicowany profil ekspresji oraz dla genów *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* i *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, cechujących się silną odpowiedzią na wernalizację. Zaprojektowano 78 par starterów na geny z grupy *FT* i 19 par na geny *FLD* i *SOC1*. Specyficzne produkty PCR uzyskano dla 77 par, a sekwencjonowanie wykonano dla 40. Zidentyfikowano loci polimorficzne pomiędzy liniami rodzicielskimi obu populacji mapujących dla genów *FT* oraz *SOC1*, a także loci polimorficzne pomiędzy liniami Parys i PRH444/14 dla genu *FLD*. Pomiedzy linią dziką P28213, a udomowioną Wodjil 33% produktów było polimorficznych. Polimorfizm między PRH444/14 a Parysem był niższy (25%). Segregację w populacji mapującej odczytano dla 12 markerów. Dla 8 markerów segregacja była zgodna z oczekiwaną (test Chi², p-value 1E-04). Odchylenie segregacji wystąpiło dla 4 markerów i wynikało z heterozygotyczności dzikiej linii rodzicielskiej. Wszystkie markery rozlokowano w grupach sprzężeń, przy czym wartości LOD dla markerów z segregacją prawidłową wyniosły 16.9-28.3, zaś dla markerów z segregacją odchyloną: 4.0-6.6. Dwa markery zmapowano w dwóch głównych loci warunkujących wczesność kwitnienia.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 2:

1. Obserwowany poziom polimorfizmu między liniami wczesnymi a późnymi łubinu żółtego jest zbliżony do tego, który występuje u łubinu wąskolistnego i białego.
2. Cecha wczesności kwitnienia łubinu żółtego jest warunkowana przez co najmniej dwa geny zlokalizowane w dwóch głównych loci QTL.
3. Uzyskanie dalszego postępu w badaniach genetycznych podstaw wczesności kwitnienia łubinu żółtego będzie możliwe przy wykorzystaniu populacji mapującej PRH444/14 × Parys, ponieważ linia PRH444/14 jest najwcześniejszą aktualnie znaną linią łubinu żółtego, wykazującą stabilny fenotyp w zakresie trzech lat doświadczeń.

Cel tematu badawczego 3:

Poznanie profilu ekspresji genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia w liniach rodzicielskich dwóch populacji mapujących w odpowiedzi na wernalizację.

Doświadczenie zostało założone w warunkach kontrolowanych w Centrum Uprawy Roślin IGR (z wernalizacją i bez wernalizacji). Nasiona roślin niewernalizowanych były wysiane 4 dni wcześniej, aby zapewnić podobną liczbę stopniodni. Materiał roślinny zebrany był co tydzień. Badano ekspresję czterech genów *FT* i genu referencyjnego (*DRHI*) wybranego na podstawie analizy wyników sekwencjonowania transkryptomu metodą RNA-seq z roku 2018. Do izolacji RNA i przepisania na cDNA oraz do ilościowego PCR używano komercyjnych zestawów (Promega). Były zastosowane po 3 powtórzenia biologiczne dla każdej z linii.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 3:

1. Wyniki analizy ekspresji genów ujawniły potencjalną funkcję regulatorową trzech genów *FT* w procesie indukcji kwitnienia łubinu żółtego i uzasadniają badanie polimorfizmu sekwencji tych genów w liniach kolekcyjnych.
2. Wyniki uzyskane dla łubinu żółtego potwierdziły wysoki stopień zachowawczości regulacji procesu indukcji kwitnienia w obrębie roślin strączkowych. W łubinie wąskolistnym głównym genem wczesności kwitnienia jest homolog z kładu *FTc1*, a w łubinie białym m. in. gen *FTa1*. U *Medicago truncatula* za wymagania wernalizacyjne odpowiada jeden z homologów *FTa1*, zaś za reakcję na fotoperiod - gen z kładu *FTb*. U soi odpowiedź fotoperiodyczną warunkują geny z kładów *FTa* i *FTc*, zaś u grochu gen *FTa1* (locus *GIGAS*).